Zeitschrift

D

Vierter

Verlag v

Nicht im Buchhandel.

5.

Abdruck

aus der

Zeitschrift für allgemeine Physiologie.

Herausgegeben von

Dr. Max Verworn,

Professor der Physiologie und Direktor des physiologischen Instituts
an der Universität Göttingen.

Vierter Band. Erstes Heft. 1904.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Nachdruck verboten.

Die Reaktion des Protoplasmas in ihrem Verhältnis zur Chemotaxis.

Von J. O. Wakelin Barratt.

(Aus dem physiologischen Institut zu Göttingen.)

Mit 1 Tafel.

(Der Redaktion zugegangen am 24. März 1904.)

Die folgende Untersuchung wurde unternommen, um festzustellen, ob irgend ein erkennbares Verhältnis zwischen der Chemotaxis gegen Säuren und Alkalien und der Färbe- und der chemischen Reaktion des Protoplasmas besteht. Wenn ein solches Verhältnis bestände, so erschiene es nicht unwahrscheinlich, daß es bei weiterer Forschung als ein bestimmender Faktor in der Chemotaxis erkannt würde und uns Aufklärung über die wesentliche Natur dieses Phänomens verschaffen könnte. Im Verlaufe dieser Arbeit stellte sich heraus, daß sie sich über den ursprünglichen Zweck der Untersuchung hinaus erstreckte; aber es wurde für besser gehalten, einen Bericht der Untersuchung in ihrer jetzigen Form, abgesehen von ihrer späteren Entwickelung, die noch nicht abgeschlossen ist, zu veröffentlichen. Dieser Artikel beschränkt sich daher auf ein Studium der normalen Reaktion des Zellenprotoplasmas und des Einflusses auf solche Reaktion, die durch Säuren und Alkalien hervorgerufen wird, welche unter Bedingungen wirksam sind, die jene Bedingungen, unter denen die Phänomena der Chemotaxis auftreten, nachahmen oder übertreiben. Nur solche Versuche, die mit Paramaecium aurelia angestellt wurden, sind hier beschrieben, da dieses Infusorium eines der geeignetsten Objekte darstellt, an welchem die Zellenreaktion beobachtet werden kann.

Der Ausdruck „Reaktion“ findet in zwei Bedeutungen Anwendung, nämlich erstens in der von Chemikern benutzten, um das Vorhandensein von freier Säure oder Base zu bezeichnen, und zweitens in der Bedeutung, welche in Bezug auf Färbemethoden allgemein üblich

geworden ist als angewandt auf Zellen und Gewebe, eine Bedeutung, welche ähnlich, obwohl nicht identisch ist den Bezeichnungen „Alkalinität“ und „Acidität“ beim Wein oder bei Körperflüssigkeiten. Der bequemeren Beschreibung wegen werden die Ausdrücke „chemische Reaktion“ und „Färbereaktion“ benutzt werden, um diese beiden Arten von Reaktion zu bezeichnen.

Im ersteren Falle, d. h. im streng chemischen Sinne des Ausdruckes, ist saure oder alkalische Reaktion auf das jeweilige Uebergewicht von Wasserstoff- bezw. Hydroxylionen in der auf ihre Reaktion hin geprüften Flüssigkeit zurückzuführen. Bei einer Säure ist die Potentialität der Flüssigkeit für katalytische Einwirkung der Konzentration von H^+-Ionen zuzuschreiben; und in ähnlicher Weise ist eine alkalische Flüssigkeit stark oder schwach, je nachdem die Konzentration ihrer OH^--Ionen groß oder klein ist.

In der zweiten Bedeutung, in welcher der Ausdruck angewendet ist, nämlich in der der Reaktion auf sogenannte saure und basische Farbstoffe, haben wir es mit den Seitengruppen zu tun, welche die Moleküle der in Betracht kommenden Substanz zeigen. Die letztere wird basisch oder sauer genannt, wenn ihre Moleküle salzbildende Seitengruppen besitzen, welche den Molekülen einen basischen bezw. sauren Charakter verleihen und sie so befähigen, mit Farbstoffen zu reagieren, worauf eine entgegengesetzte Eigentümlichkeit von den entsprechenden Seitengruppen erteilt wird. Kenntnis über die Reaktion der Gewebebestandteile in dem augenblicklich in Betracht kommenden Sinne ist nur erreichbar, wenn der Färbeprozeß als eine chemische Reaktion zwischen zwei Salzen angesehen werden kann, und solche Färbemethoden, die eine rein physikalische Erklärung zulassen, können nicht Verwendung finden [1]).

Methode.

Bei der Untersuchung der Reaktion im streng chemischen Sinne des Wortes wurden Indikatoren verwandt unter Benutzung von Resultaten, die Friedenthal [2]) in seinen Untersuchungen über die wechselnde Reaktion dieser Indikatoren in Bezug auf saure und

1) Ch. A. Pappenheim, Grundriß der Farbchemie, 1901, p. 286 ff. Auch Gustav Mann, Physiological Histolology, 1902, p. 327—370.

2) Ueber die Reaktion des menschlichen Harnes, Arch. f. [Anat. und] Physiol., 1903, p. 397—411; auch Verhandl. d. physiol. Ges. zu Berlin, Jahrgang 1902—03, No. 10—11; Ueber die Reaktion des Blutserums der Wirbeltiere, Zeitschrift f. allg. Physiol., Bd. 2, 1902, p. 56—66.

alkalische Lösungen, deren Ionisation bereits aus ihrer elektrischen Leitfähigkeit und andern physikalischen Eigentümlichkeiten bekannt ist, gewonnen hat. Mittels solcher kolorimetrischer Beobachtungen kann die Konzentration von H^+- und OH^--Ionen quantitativ innerhalb der von den angewandten individuellen Indikatoren abhängigen Grenzen bestimmt werden. Die gewöhnlich benutzten Indikatoren waren Phenolphtaleïn und Methylorange, welche in Flüssigkeiten Konzentrationen von 0,0001 N.-Stärke von OH^-- bezw. H^+-Ionen ergeben. Andere benutzte Indikatoren waren Lakmoid, Lackmus, Galleïn, sulphalizarinsaures Natron, Neutralrot, Rosolsäure und p-Nitrophenol [1]).

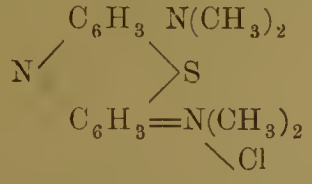
Die Bestimmung der Färbereaktion, d. h. des basischen (oxyphilen) oder sauren (basophilen) Charakters des Zellenprotoplasmas wurde gewöhnlich mittels Methylenblau-Eosins ausgeführt. Dieser Farbstoff kann in der Form von 0,0001 N.-Lösung (0,006 Proz.) in destilliertem Wasser zu unmittelbar vitaler Färbung verwendet werden. In Methylalkohol in Form einer 0,01 N.-Lösung (0,6 Proz.) aufgelöst und als regressiver Farbstoff [2]) verwendet, liefert er eine feine Probe von der Reaktion der Zellenbestandteile; und da es eine Lösung von einem einzigen Salz [3]) ist, so gewährt sie ein viel einfacheres Mittel zur Differenzierung zwischen basischen und sauren Eigenschaften, als die aufeinanderfolgende Anwendung von Methylenblau und Eosin und ist gleichzeitig frei von den Nachteilen der letzteren. Insbesondere verleiht der Gebrauch dieses Farbstoffes, der aus Salz von spezifischem Charakter besteht und nicht eine Mischung zweier Farben darstellt, die Gewißheit, daß die rote und blaue Färbung durch eine chemische Verbindung mit den basischen und sauren Radikalen des Farbstoffes bewirkt wird, während eine physikalische Erklärung der

---

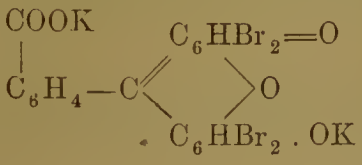
1) Cf. Friedenthal, loc. cit.

2) Scott, Journ. of Path. u. Bacteriol., 1901.

3) Methylenblau-Eosin entsteht durch die Reaktion von zwei Molekülen Methylenblau (Tetramethyldiamidothiodiphenylamin)



mit einem Molekül Eosin (Kalisalz des Tetrabromfluoresceïns)



sich ergebenden Differenzierung nicht denkbar ist. Die Färbereaktion mit Methylenblau-Eosin erwies sich als unabhängig von der Weise, in welcher die Organismen fixiert werden. Die Fixation durch Trocknen, durch heißes Wasser, durch 10 Proz. Formol oder durch Alkohol[1]) übt keine Wirkung auf die Natur der sich ergebenden Färbung aus, obgleich sie die Stärke der Färbung beträchtlich beeinflußt; mit anderen Worten: die Wirkung der Fixation ist eine quantitative und nicht eine qualitative. Nach gründlichem Trocknen färben sich die Paramäcien schwach und werden dementsprechend unvollkommen differenziert. Die Intensität der Färbung ist am größten nach Alkoholfixation; sie ist nicht annähernd so gut, wenn Formol verwendet wird. Alle Fixiermethoden verursachen eine Entstellung der Organismen, Formol am wenigsten von allen.

Färbereaktion des Paramaeciums.

Bei Betrachtung der Reaktion der zu den Versuchen herangezogenen Organismen wird es dienlich sein, zuerst die der toten Paramäcien zu berücksichtigen und darnach die der lebenden. Die Organismen wurden in allen Fällen aus sich lebhaft bewegenden Exemplaren gewählt, waren vorher reichlich gefüttert worden, und wurden 24 Stunden vor der Untersuchung in destilliertes Wasser gebracht.

Wenn durch Hitze oder Alkohol getötete Paramäcien mit Methylenblau-Eosin (Fig. 1) gefärbt werden, so zeigt sich das Endoplasma mit feinen Granulis von 0,4 μ bis 1,0 μ im Durchmesser gefüllt, welche nach der in Verbindung mit Färbeprozessen angewandten Terminologie von basischem oder oxyphilem Charakter sind, indem sie die rötliche Farbe des Eosins annehmen. Außerdem enthält das Zellenprotoplasma Granula oder Massen von größerem Umfang, welche die Farbe des Methylenblaues annehmen. Die größeren derselben befinden sich in Vakuolen (Fig. 4), aber diese Bestandteile des Zellenprotoplasmas, welche von der aufgenommenen Nahrung herrühren, sind bei dem Paramaecium nicht so auffallend in Massen angehäuft wie z. B. bei Colpidium. Vakuolen sind in wechselndem Maße im Zellenprotoplasma bei verschiedenen Individuen vorhanden. Der Rest des Cytoplasmas, abgesehen von den oxyphilen und basophilen Granulis und den Exkretkörpern oder Kristallen, welche von hellbraun

1) Die benutzte Formollösung war leicht, doch ausgesprochen sauer, während der verwendete Alkohol neutralem Litmuspapier eine schwache rötliche Färbung verlieh.

bis schwarz in der Farbe wechseln und deren Anzahl bei verschiedenen Exemplaren sich beträchtlich verändert, bleibt ungefärbt. Der Nucleus wählt das basische Radikal des Methylenblau-Eosinmoleküls und färbt sich blau, indem die unregelmäßig verteilte Farbe ein schmutziges Aussehen gewinnt. Ist ein Centrosom vorhanden, so nimmt auch dieses eine blaue Färbung an. Die Zellenpellicula, die Trichocysten und Cilien bleiben ungefärbt, Es geschieht zuweilen, jedoch selten, daß im Falle, wo das Protoplasma tief gefärbt ist, auch die Zellenpellicula und die Cilien eine rötliche Färbung annehmen.

Vitales Färben der Paramäcien mit Neutralrot ist von Prowazek[1]) und Wallengren[2]) beschrieben worden, die feststellten, daß die Nahrungsmassen des Endoplasmas wie auch feine Granula sich färben, indem sie eine um so tiefere Färbung annehmen, je mehr der Verdauungsprozeß vorgeschritten ist. Feine runde Granula, die in Beziehung zu den Trichocysten stehen, werden ebenfalls gefärbt[3]). Die Beschreibung über vitales Färben der Paramäcien von Stolc[4]) ist ähnlich der der beiden vorangehenden Beobachter.

Werden lebende Paramäcien in eine schwache Lösung von Methylenblau-Eosin gebracht, so färben sie sich nach Verlauf einiger Stunden. Nach Ablauf von 24 Stunden hat die Färbung ihren Höhepunkt erreicht. Die Cilien, die Zellenpellicula und der Nucleus bleiben ungefärbt (Fig. 2), aber die basophilen Granula im Endoplasma färben sich tiefblau. Die beim Colpidium so auffällige Erscheinung von blau gefärbten Nahrungsmassen bei vitalem Färben fällt beim Paramaecium fort. Keine Färbung der Flüssigkeit in der kontraktilen Vakuole oder anderen Vakuolen ist wahrnehmbar. Keine weiteren Zellenelemente sind gefärbt und in keinem Teil des Paramaeciums ist eine rote Farbe sichtbar. Es erhellt daraus, daß bei vitalem Färben wie auch bei Färben nach dem Tode die Methylenblau-Eosinmoleküle aufgelöst werden, indem im ersteren Falle sich nur das basische Radikal mit einem Teil des Zelleninhaltes verbindet. Wenn Paramäcien mittelst Methylenblaues und Eosins getrennt vital gefärbt werden, so ist das Ergebnis dasselbe, als wenn Methylenblau-Eosin

---

1) Vitalfärbung mit Neutralrot an Protozoon, Zeitschr. f. wiss. Zool., Bd. 63, 1898, p. 187.

2) Inanitionserscheinungen der Zelle, Zeitschr. f. allg. Physiol., Bd. 1, 1902, p. 67—128.

3) Wallengren, l. c. p. 77.

4) Ueber das Verhalten des Neutralrots im lebendigen Protoplasma, Zeitschr. f. allg. Physiol., Bd. 1, 1902, p. 209—219.

gebraucht ist, nur daß der erstere Farbstoff die basophilen Granula in dem Endoplasma färbt, während die übrigen Bestandteile frei von roter oder blauer Farbe bleiben.

Der Einfluß von Säuren auf das Paramaecium ist in seiner Wirkung auf die Färbereaktion verschieden, je nachdem die angewandte Konzentration entweder 1) derjenigen gleicht oder um ein geringes größer als eine solche ist, die eine Frist von 20—30 Minuten zum Töten des Organismus beansprucht, und diese kann für praktische Zwecke als die minimal tödliche Konzentration betrachtet werden; oder 2) von beträchtlich größerer Stärke ist. Wenn ein Paramaecium in eine 0,0001 N-Lösung von Salzsäure, Salpetersäure oder Schwefelsäure gebracht wird, bis nach Verlauf von ungefähr einer halben Stunde der Tod eingetreten ist, oder wenn es in einer gleich tödlichen Konzentration von Essig-, Phosphor-, Milch-, Tartron-, Aepfel-, Oxal-, Kohlen- oder Borsäure getötet wird, so stellt sich heraus, daß, nachdem das Paramaecium nacheinander in destilliertem Wasser und Alkohol gespült ist, seine Farbreaktion in Bezug auf Methylenblau-Eosin sich als ganz unverändert erweist. Wiederholte Versuche haben dargetan, daß keine Veränderung der Färbereaktion erzeugt wird dadurch, daß der Organismus einer verdünnten Säure während der zum Töten desselben erforderlichen Zeitdauer ausgesetzt wurde. Entgegen allen Erwartungen tritt weder eine Verstärkung der blauen Färbung ein, noch zeigt jener Teil der Zelle, der normal rot gefärbt ist, eine Neigung, eine purpurne Farbe anzunehmen, noch scheinen die Zellenbestandteile, die gewöhnlich ungefärbt bleiben, eine Tendenz zur Färbung zu gewinnen. Auch abgesehen von der Färbung ist keine charakteristische Veränderung der Struktur bemerkbar, so daß Fig. 1, welche ein durch Hitze oder Alkohol fixiertes Paramaecium darstellt, ebensowohl ein Paramaecium veranschaulichen könnte, das getötet wurde, indem es kurze Zeit einer Säure von minimal tödlicher Konzentration ausgesetzt war. Auch erzeugt die Säure keine Veränderung in der mit dem bloßen Auge sichtbaren Erscheinung des Organismus. Durch Säuren getötete Paramäcien bewahren ihre Form gut in destilliertem Wasser, in welchem sie eine halbe Stunde oder länger, ohne aufzuschwellen, verbleiben können.

Wenn jedoch Paramäcien der Einwirkung starker Säuren ausgesetzt werden, z. B. einer 0,02 N.-Lösung von Salzsäure, Salpetersäure oder Schwefelsäure oder einer gleich wirksamen Konzentration einer schwächeren Säure, so tritt eine bemerkenswerte Veränderung in der Färbereaktion in Bezug auf Methylenblau-Eosin ein, welche Fig. 3 veranschaulicht und welche ähnlich der den Histologen wohl bekannten Veränderung ist, die in Geweben vorkommt, deren Färbung

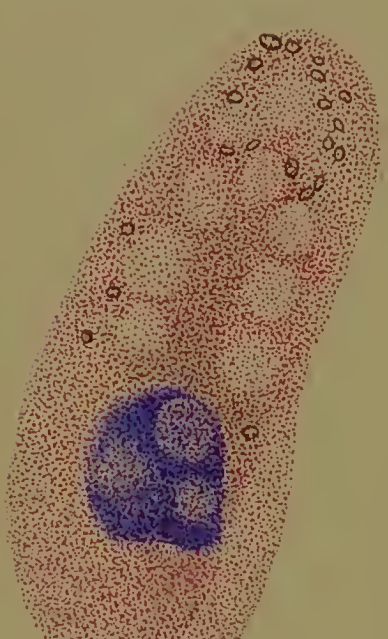


Fig. 1.

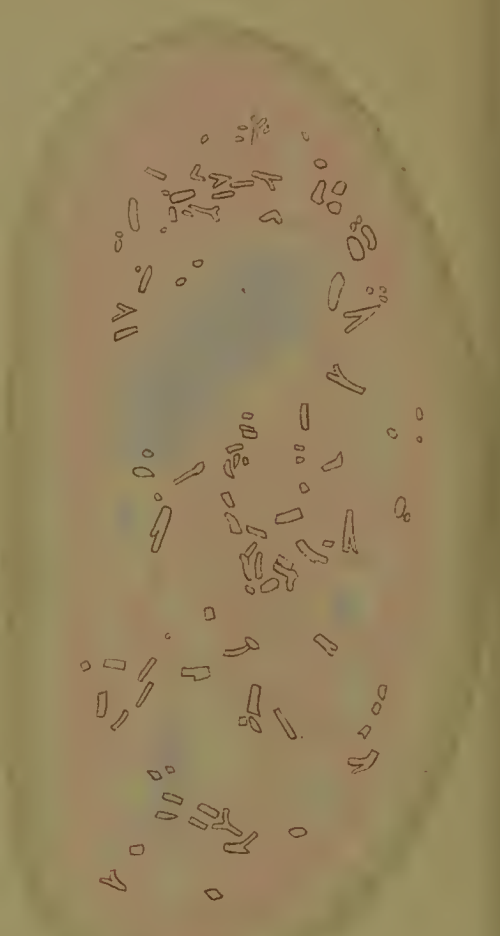


Fig. 3.

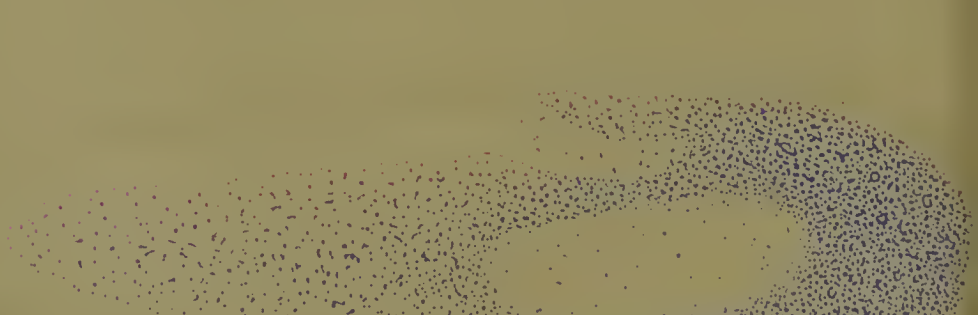


Fig. 2.

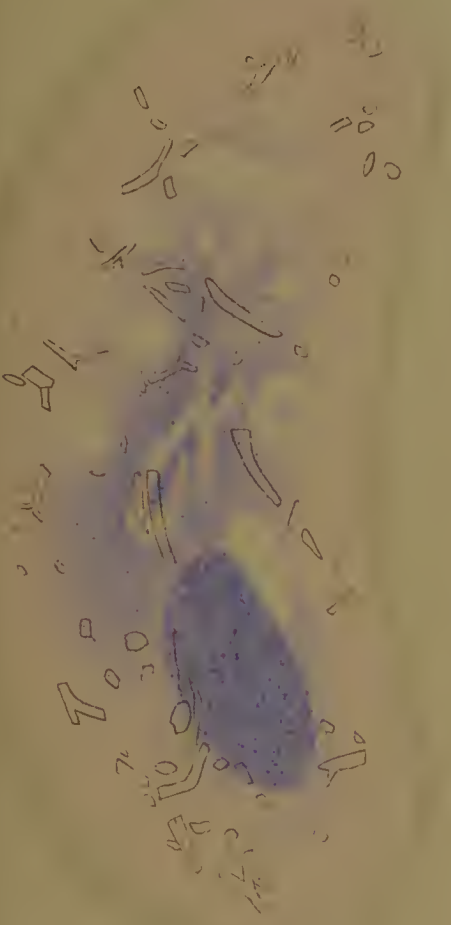


Fig. 4.

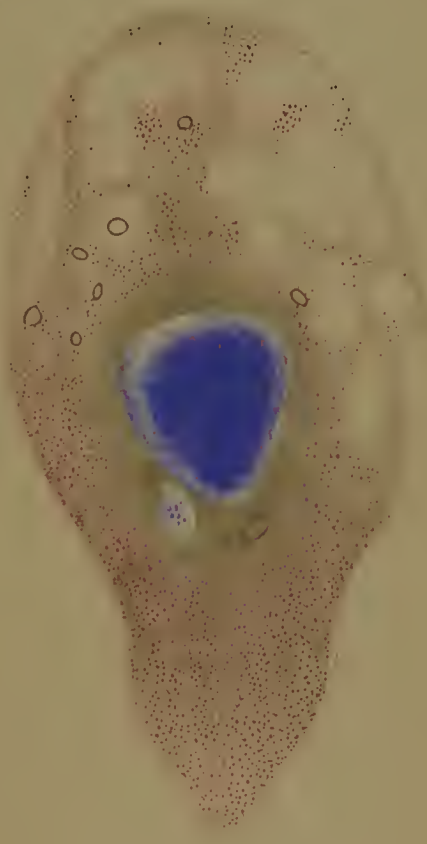


Fig. 5.

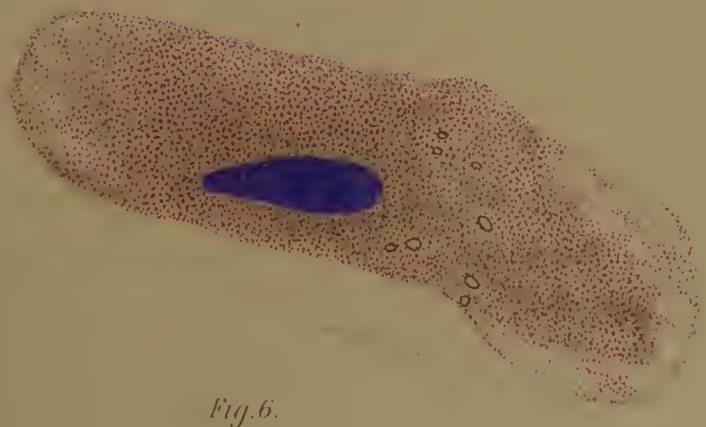


Fig. 6.

100 μ

20cm
STAINLESS STEEL
24ColorCard CameraTrax.com